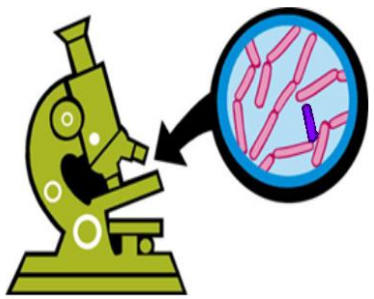
Práctica 3: Tinción de Gram

© Olga Rivas Solano 2026

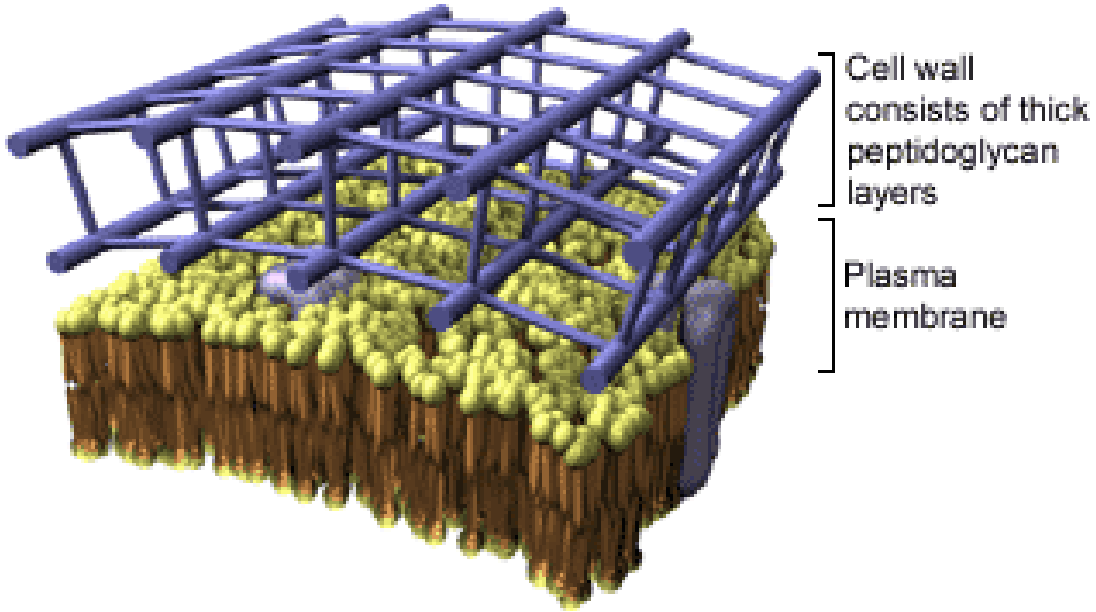
Tinciones

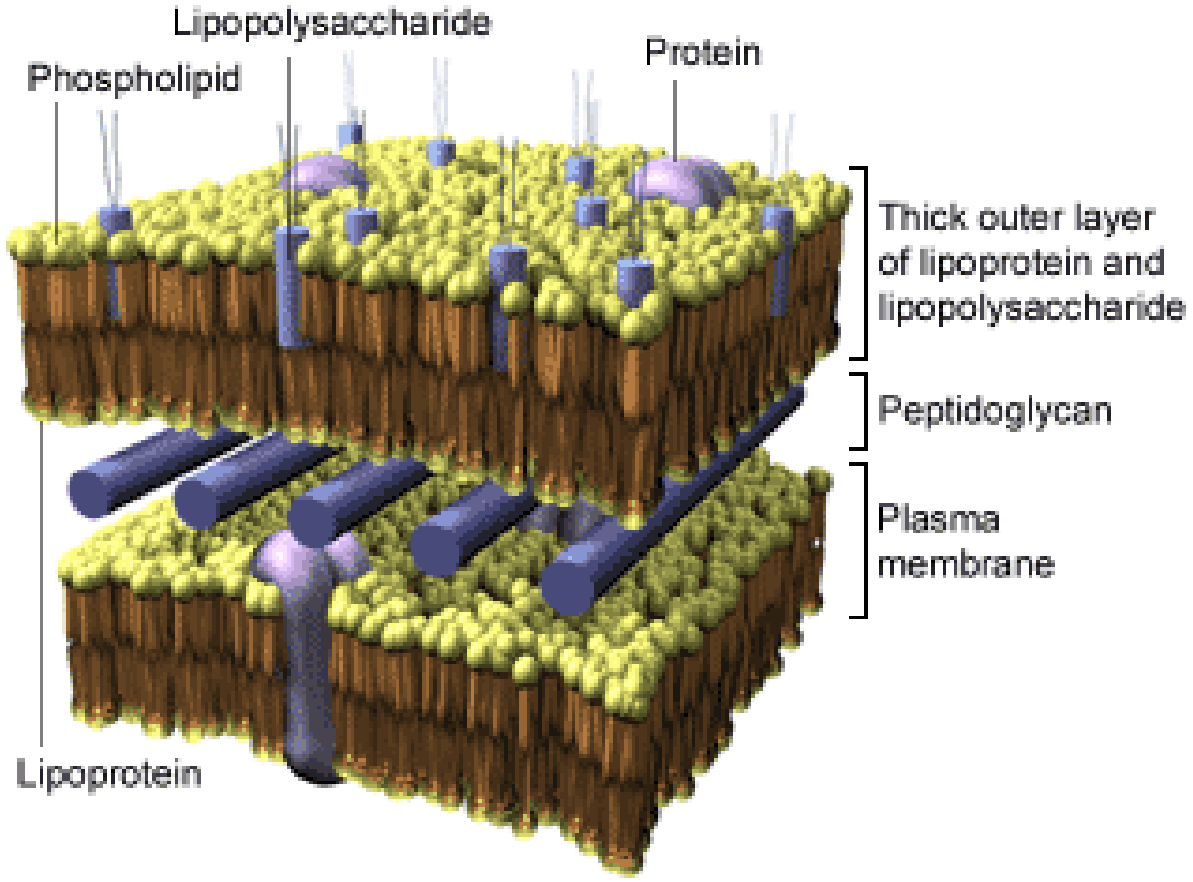
- ¿Porqué aplicar tinciones?
- Los microorganismos tienen el mismo índice de refracción que el vidrio
- Los colorantes tienen afinidad por estructuras celulares y ayudan a generar contraste



- Tipos de tinciones
- Simples: un solo colorante, todo se ve del mismo color
  - Ej. Práctica 1
- Diferenciales: un mismo procedimiento de tinción, no tiñe del mismo color a dos bacterias que presentan diferencias estructurales entre sí
  - Ej. Tinción de Gram

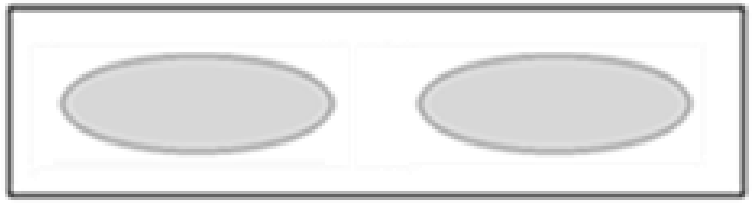
Repaso de las diferencias estructurales en la composición de la pared celular entre bacterias Gram- y Gram+





Esta práctica es individual, cada estudiante preparará dos portaobjetos:

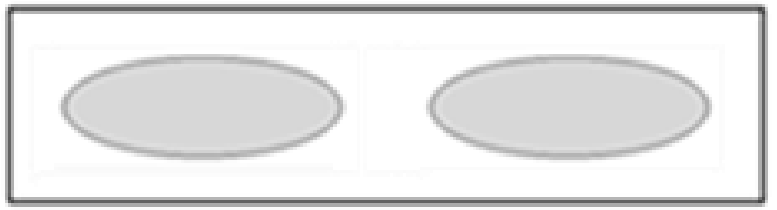
Portaobjetos 1:



Incógnita 1 (método directo) | Control mixto (método directo)

- Al lado derecho, tendrá un control mixto preparado por el "método directo".
- Al lado izquierdo tendrá la incógnita 1 preparada por el "método directo".

Portaobjetos 2:



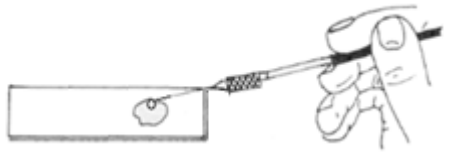
Incógnita 2 (método directo) | Control mixto (método suspensión)

- Al lado derecho, tendrá un control mixto preparado por el "método suspensión".
- Al lado izquierdo tendrá la incógnita 1 preparada por el "método directo".

Paso 1: preparación del frotis mixto de *E. coli* y *S. aureus*
a. "Método directo" en el portaobjetos:

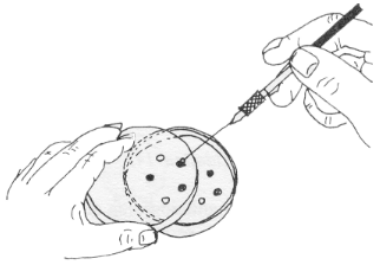
1. Flamear el asa bacteriológica

2. Colocar ≈3-5 asadas de SSE al lado derecho de un portaobjetos limpio y desengrasado

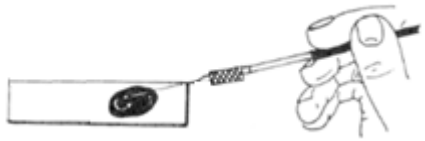


3. Flamear el asa de punta

4. Tomar una muestra de uno de los dos cultivos

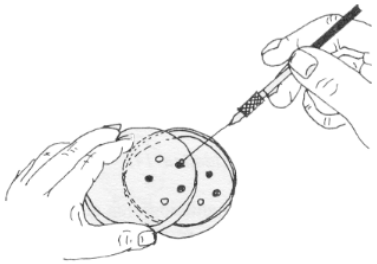


5. Disolver la muestra en la gota de SSE



6. Flamear el asa de punta

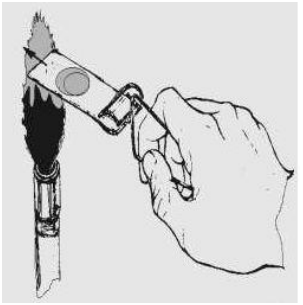
7. Tomar una muestra del otro cultivo



8. Disolver la segunda muestra en la misma gota y extender la preparación

9. Repetir el procedimiento al lado izquierdo con la incógnita 1 y dejar secar ambos frotis completamente

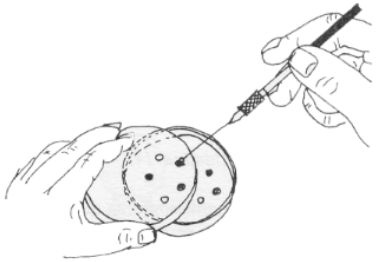
10. Fijar pasando tres veces por la llama



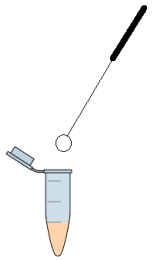
Paso 1: preparación del frotis mixto de *E. coli* y *S. aureus*
b. "Método suspensión":

1. Flamear el asa bacteriológica

2. Tomar una muestra de uno de los dos cultivos

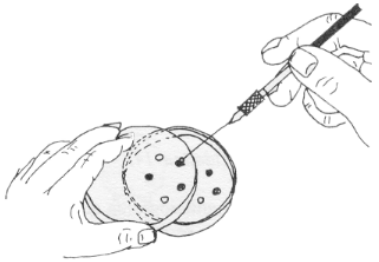


3. Disolver en un Eppendorf con SSE

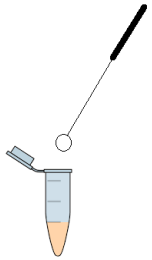


4. Flamear el asa bacteriológica

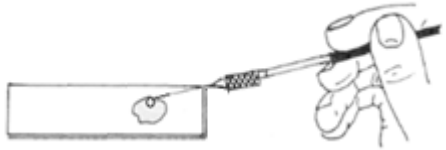
5. Tomar una muestra del otro cultivo



6. Disolver en el mismo tubo

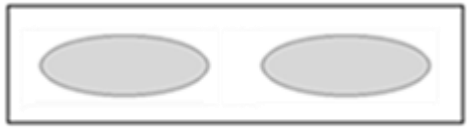


7. Colocar ≈3-5 asadas de suspensión mixta al lado derecho de un portaobjetos limpio y desengrasado

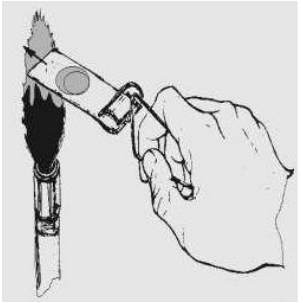


8. Extender la preparación

9. Al lado izquierdo, hacer un frotis de la incógnita 2, por el método 1a y dejar secar completamente a temperatura ambiente



10. Fijar pasando tres veces por la llama



Paso 2: tinción

Cristal Violeta 1 min

↓ Lavar los excesos

Lugol 1 min

↓ Lavar los excesos

Decolorante (alchool:acetona 1:1)

↓ Lavar los excesos

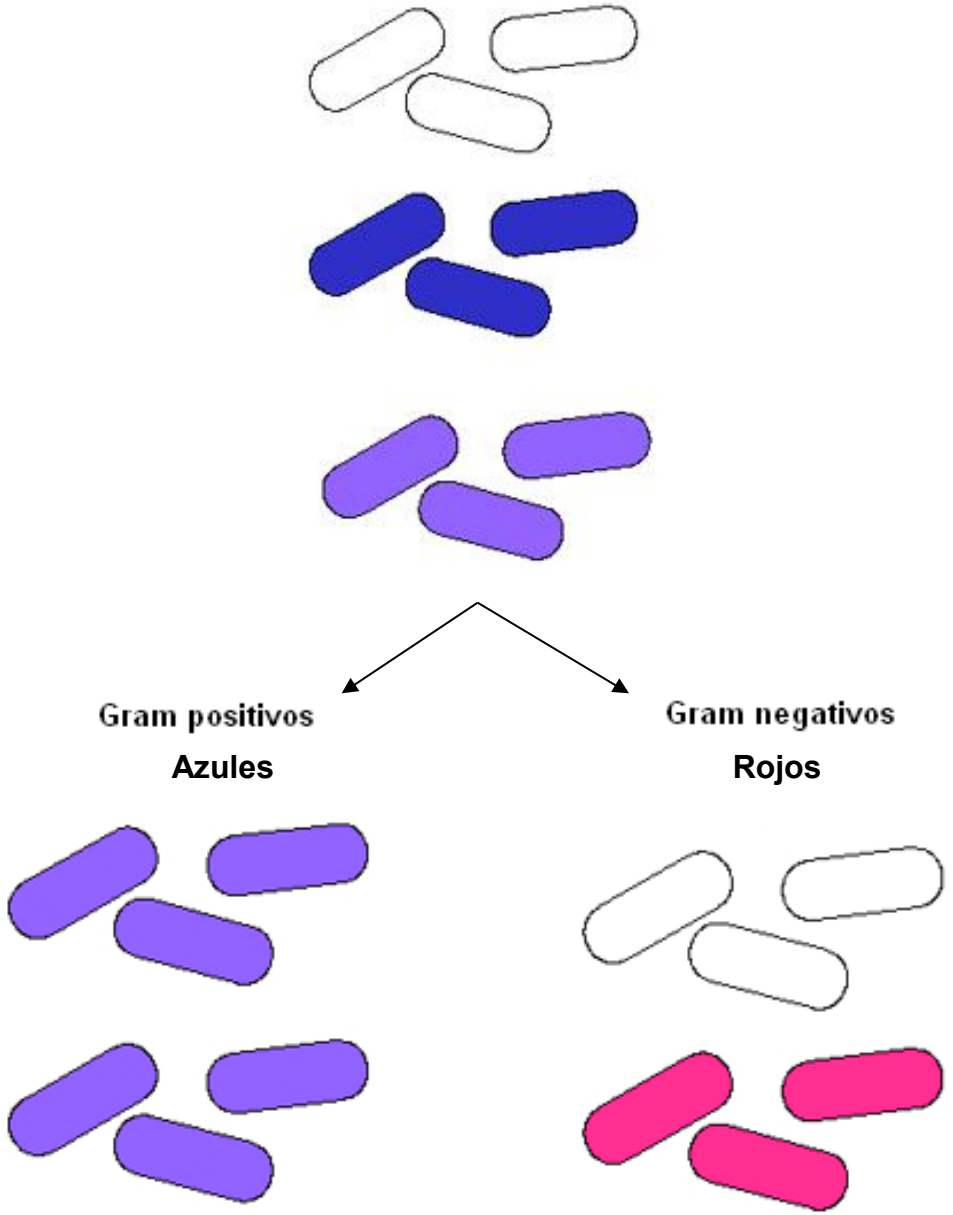
Contratinción con safranina 1 min

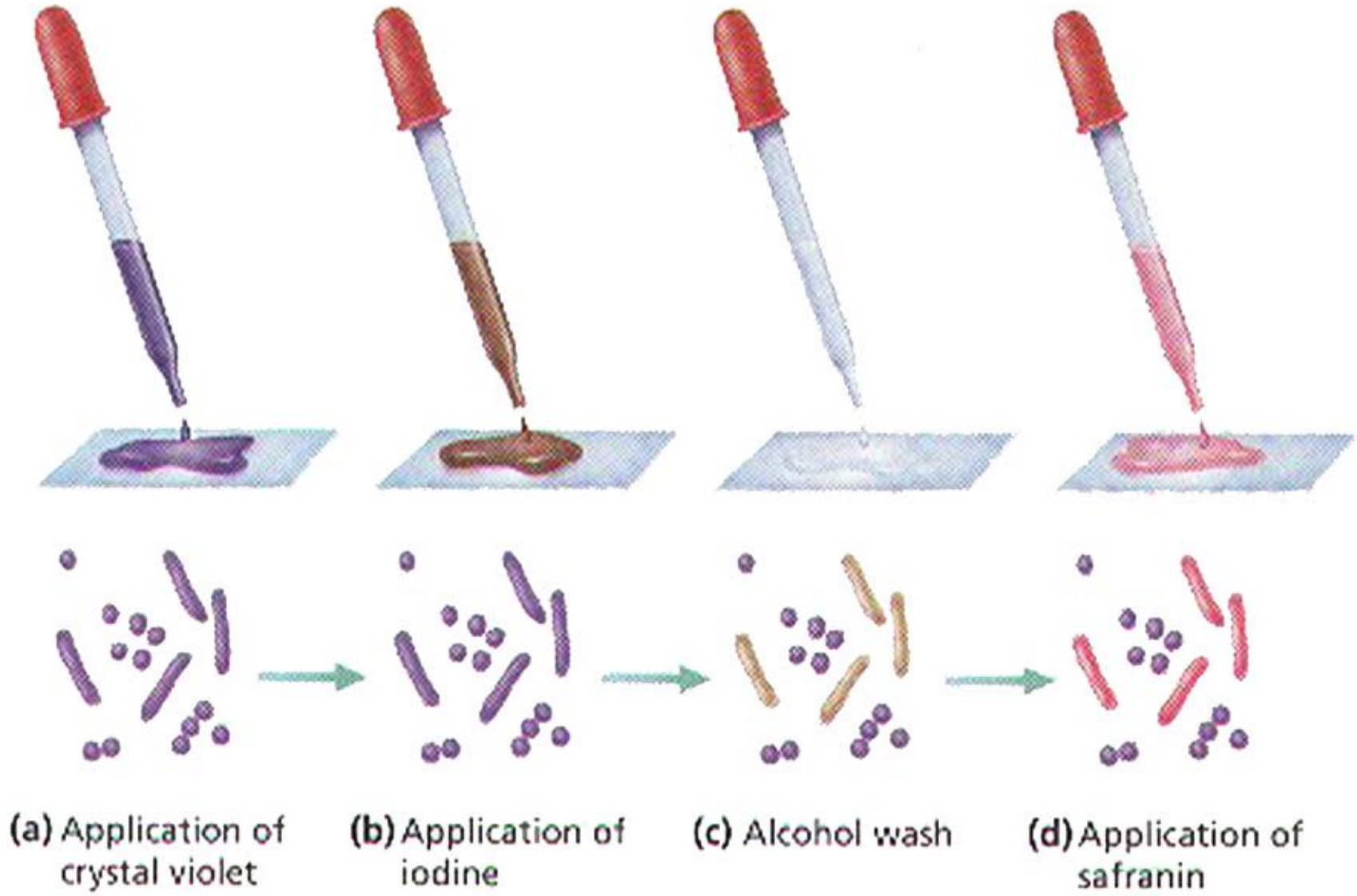
↓ Lavar los excesos

Secado a temperatura ambiente

↓

Observación al microscopio





(a) Application of crystal violet

(b) Application of iodine

(c) Alcohol wash

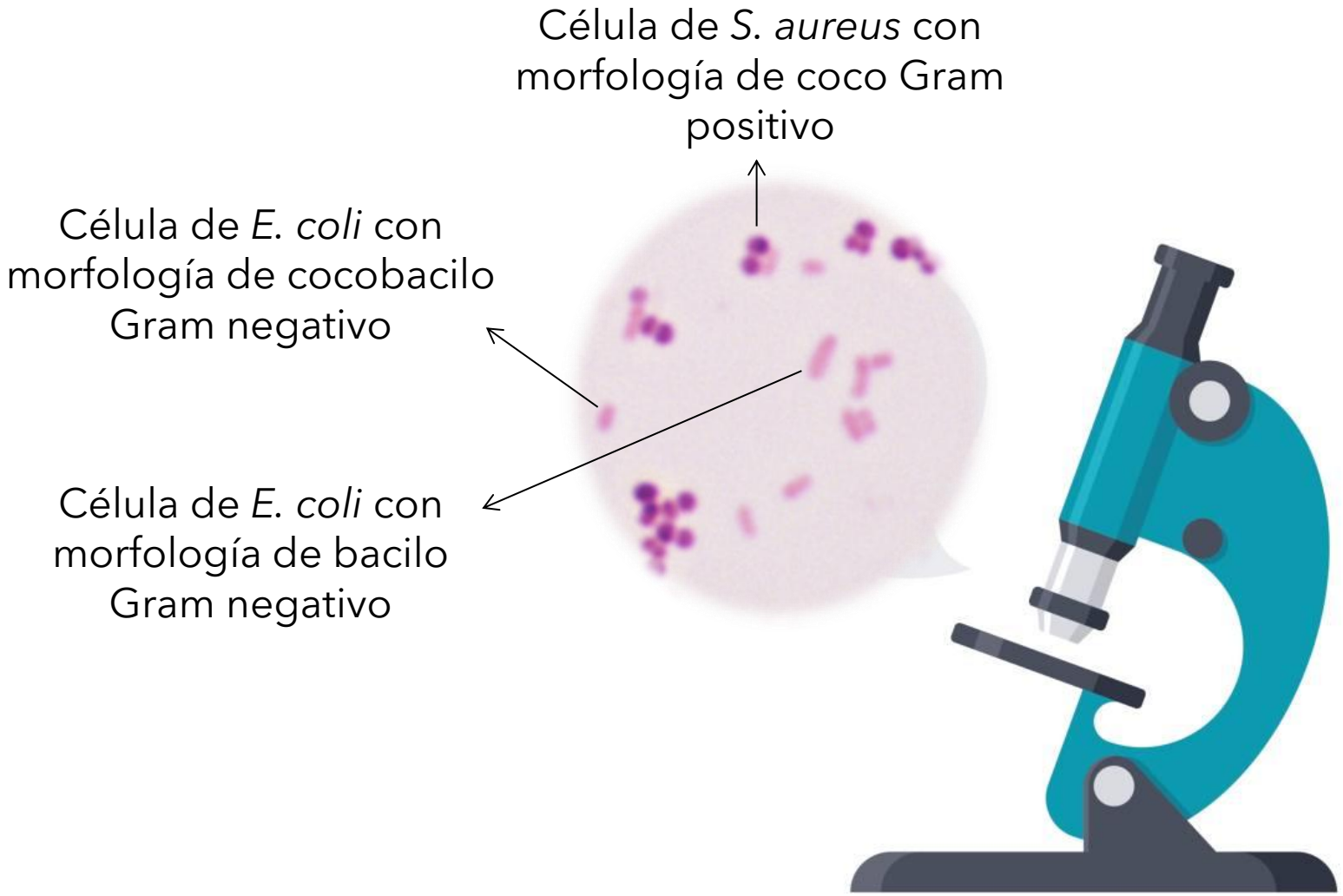
(d) Application of safranin

Paso 3: ver al microscopio

S. aureus: Se tiñe de morado y es muy circular y más pequeño que un cocobacilo

E. coli: Se tiñe de rojo y puede presentar morfología de cocobacilo cuando la célula es joven y de bacilo cuando la célula ha alcanzado su tamaño normal

Resultado esperado:



Ejemplos de equipos automatizados para tinción de Gram

PREVI® Color

Sistema automatizado de tinción de Gram

- Resultados estandarizados
- Fácil de usar
- Seguro y limpio

BIOMÉRIEUX

https://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/previr-color

Aerospray®

https://prolabchile.com/aerospray/

Se utilizan en laboratorios con alto volumen de muestras. Tienen un carrusel para procesar varias láminas a la vez (hasta 30), sin posibilidad de contaminación cruzada, debido a que las láminas están separadas y se aplica reactivo fresco en cada lámina. Además, se utilizan cantidades estandarizadas de colorantes y decolorante, que se pueden personalizar a criterio del analista, según si prefiere mayor o menor intensidad de color. Por último, facilitan la trazabilidad porque almacenan el código de muestra y la identificación del usuario que la procesó.